

ZÁRÓJELENTÉS (OTKA 71883)

Cím: Új terápiás módszerek kifejlesztése és hatásmechanizmusának tanulmányozása poliszisztémás autoimmun kórképekben

Vezető kutató: *Sipka Sándor (A)*

Résztvevők: *Baráth Sándor (B))*

Griger Zoltán (C)

Sipka Sándor (A)

Tarr Tünde (D)

Váróczy László (E)

Zeher Margit (F)

Zilahi Erika (G)

Cziffra Gabriella (2011-től)(H)

A pályázati program megvalósítása közben 2008-2012 között három változtatás történt az eredeti tervhez képest:

- a.) Griger Zoltán időközben történt más megbízatásai miatt a kísérletek végzésébe 2010-től belépett *Cziffra Gabriella* (DE OEC Élettani Intézet).
- b.) Váratlan új kutatási eredmények miatt új elemként lépett be a miRNS-146a és a TRAF6 vizsgálatok végzése a Sjögren szindrómás betegekben.
- c.) Az új kutatási profil létrejötté miatt engedélyt kértünk az OTKA bizottságtól a pénzügyi keret felhasználásának megváltoztatására az újabb kísérletek elvégzésének érdekében 2011-ben.

A pályázati célok megfogalmazásának háttere:

1.) A DE OEC III. Belgyógyászati Klinika Immunológiai Tanszékén és Immunológiai Laboratóriumában szerencsés módon álltak össze a következő feltételek:

a.) a Klinika több, mint 4000 poliszisztémás autoimmun beteg gondozását végzi több évtizede,

b.) itt indult el az országban elsőnek az autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció (AHÖT) az egyéb terápiára rezisztens, poliszisztémás autoimmun betegeken új terápiás módszereként;

c.) korábban az Immunológiai Laborban az Élettani Intézet kutatóival kollaborációban sikerült arra az új felismerésre jutnom, hogy az SLE-s betegek mononukleáris sejtjeiben (limfocitáiban, monocitáiban) néhány protein kináz C (PKC) izoenzim expressziója csökkent, és ez okozhat betegség specifikus zavarokat a működésükben. Ezért a PKC izoenzim szintek és működés gyógyszeres javítása új terápiás lehetőséget jelent, jelenthet. Mivel ismert, hogy az SLE T limfocitákban fokozott proteozóma aktivitás van (Jury EC et al. 2003, Arthr. Rheum), logikusnak és kézenfekvőnek látszott az a feltételezés, hogy a csökkent PKC szint a ennek a következménye lehet ezekben a sejtekben, és akár a már jelenleg gyakorlatban használt proteozóma gátló gyógyszerekkel emelni lehet a PKC szinteket, javítani tudjuk a működést. A figyelmünk a jól ismert proteozóma gátló Bortezomib (Velcade) és a vitálisan fontos D3 vitamin irányába fordult, mivel az utóbbival kapcsolatban meg is jelent olyan közlés, hogy (legalább is) bőr sejtekben proteozóma gátlást okoz (Li XY et al, 1999, Mol Endocrinol). Ugyanakkor a folyamatos D₃ vitamin szupplementáció SLE-ben általánosan vált ajánlottá az utóbbi időben (Borba VZ et al, 2009, Osteoporos Int).

2. A pályázatban kitűzött célok teljesítésének, az itt feltett kérdések megválaszolásának jelenlegi helyzete:

A pályázatban megfogalmazott minden fő cél elérésre került, minden feltett kérdésre a válasz közleményekben lezárt formában elkészült, és már vagy megjelent, vagy közlés alatt van. Emellett egy új szemléletű, összefoglaló cikket is írtam a saját kísérleti eredményeinkre alapozva a PKC enzimek szerepét illetően az SLE tüneteinek patogenezisében, amiben felhasználtam ennek a pályázatnak részeredményeit is. A pályázathoz kapcsolatosan két nemzetközi konferencián vettem részt. Az egyiken előadást tartottam, a másikra posztot vittem.

3. A pályázatban eredetileg nem szereplő, váratlan felismerésen alapuló új téma belépése:

A PKC izoenzim reguláció tágabb tanulmányozása érdekében vizsgálni kezdtük az SLE-s és Sjögren szindrómás betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben a mikroRNS-146 a/b(miRNS-146), továbbá az ehhez kapcsolódó regulációs gének, az IRAK1, IRAK4 és TRAF6 expresszióját. Az SLE-sekben azt találtuk, amit már korábban mások is leírtak, hogy inaktív betegekben csökkent a miRNS-146a és emelkedett az IRAK1 gén szintje, míg a TRAF6 nem változott. A Sjögren-es betegekben viszont az emelkedett miRNS-146a mellett az „elvárt” IRAK1 csökkenést, míg a „meglepetést jelentő” TRAF6 szint emelkedést találtunk. Az utóbbi másfél évben ennek a jelenségnek a hátterét és okát kezdtük vizsgálni a munkatársaimmal.

4. EREDMÉNYEK

a.) *A CD8+ T limfociták számának változása a perifériás vérben különböző autoimmun betegségekben autológ haematopoetikus őssejt transzplantáció (AHÖT) után, és ezek prognosztikus értéke*

A hagyományos terápiára rezisztens 14 (11 nő, 3 férfi) autoimmun (SLE 3, szisztémás sclerosis 3, rheumatoid arthritis 2, sclerosis multiplex 2, „overlap” 4) beteg vérében vizsgáltuk AHÖT előtt, majd 30 és 60 nappal ezután a limfociták különböző alosztályaiba (CD3+, CD4+, CD8+, CD56+) tartozó sejtjeinek szám változásait, továbbá az ezeket kísérő citokin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-15, IL-16) szint változásokat, és ezek kapcsolatát a két éves túlélés adataival. Azt találtuk, hogy a perifériás vérben a citotoxikus CD8+ T sejtek száma fokozatosan és legnagyobb mértékben emelkedik a transzplantáció utáni első két hónapban. Annál a négy betegnél, aki nem élt két évet az AHÖT után, a CD8+ sejtek száma a 30. napon nem érte el a 150 sejt/μl értéket. Ez azt mutatja, hogy a CD8+ sejt szám mérésnek prognosztikus értéke van, és alkalmasnak látszik az AHÖT utáni limfocita regenerációs folyamatok monitorozására. A vizsgált citokinek közül egyedül az IL-6 szérumszintjének emelkedése mutatott párhuzamosságot a CD8+ sejtszámmal.

(A kézirat bírálat alatt van az Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis-ban)

b.) *A Bortezomib eltérő hatása a PKC izoenzimek expressziójára SLE-s betegek T sejtjeiben és Jurkat sejteken*

A proteasoma inhibitor Bortezomib (BZ) hatását tanulmányoztuk 24 órás T limfocita és Jurkat sejt (humán T sejt vonal) tenyészetekben 10 SLE-s beteg és 9 egészséges kontroll személynél a PKC izoenzimek expressziójára, a sejtek proliferációs rátájára és apoptózisára. A BZ eltérő módon hatott a kontrollok, a betegek sejtjein és a sejt vonalon. Míg a Jurkat sejteken szignifikánsan emelte a PKC θ , δ , és ξ szintjeit, ezt nem hozta létre a „lupus” sejtekben. Emellett a Jurkat sejtekben még gátolta a proliferációt és fokozta az apoptózist. Az apoptózis fokozó hatás megvolt mind a betegek, mind a kontrollok sejtjeinél. A vizsgálataink

rávilágítanak arra, hogy lényeges szignalizációs különbségek vannak az emberi T sejtek és a Jurkat sejtek között. (Ezt sokan figyelmen kívül hagyják!) Fontos felismerés, hogy a BZ alkalmazása új, kiegészítő terápiás szerként az SLE-ben csak korlátozott lehet más autoimmun kórképekhez vagy kísérletes állat modellekhez képest, mivel nem tudja megemelni a PKC izoenzim szinteket a T sejtekben, bár az apoptózist fokozó hatása kedvező lehet az autoreaktiv T sejtek eliminációjában.

(Ez a cikk megjelent 2011-ben a Scand. J. Immunol.-ban)

c. Az alacsony és nagy dózisú D₃ vitamin in vitro hatása a T limfociták PKC izoenzimeinek expressziójára és citokin termelésére SLE-s betegekben és egészséges kontrollokban
Alacsony (1nM) és magas (100 nM) D₃ (1 α -25 dihidroxi) vitamin jelenlétében 48 órán át in vitro vizsgáltuk 13 SLE-s beteg és 13 egészséges kontroll T sejtjeit. „Western blot” analízissel értékeltük a PKC α , β , δ , ϵ és ξ izoenzimek expresszióját, továbbá mértük a képződött citokinek (IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ és TNF α) mennyiségét ELISA kitékkel. Sem az alacsony (1nM), sem a magas (100 nM) D₃ vitamin nem tudta emelni a PKC izoenzim szinteket sem a betegek, sem a kontrollok sejtjeiben, a citokin szintekben azonban történtek változások. Az egészségesekben már a kis adag D₃ vitamin is szignifikánsan csökkentette az IL-2 és IFN γ termelést. A magas dózis az egészségesekben szignifikánsan csökkentette –az IL-10 kivételével – mindegyik proinflammatorikus citokin termelését, míg az anti-inflammatorikus IL-10 termelést szignifikánsan fokozta. Ez egy jelentősen „gyulladás-gátolt” állapot kialakítását jelenti. Ugyanakkor ez a hatás csökkentebb mértékben jelent meg a betegek sejtjeiben. Náluk a kis dózisú vitamin lényegében hatástalan, bár az alacsony IL-2 szintet tovább csökkenti, ha nem is szignifikánsan. A nagy dózisú vitamin IL-10 emelő hatása megvan, de nem szignifikáns, és csak az IL-2 és az IFN γ gátlása szignifikáns. Az IL-2 „kérdés” külön figyelmet érdemel. Ismert, hogy az SLE-s T sejtek kórosan csökkent IL-2 termelése a betegség egyik legfőbb jellemzője és patogenetikai faktora. A kísérleteinkben ezt már az 1nM D₃ vitamin is tovább csökkentette, míg a 100nM pedig csaknem megszüntette a termelését. Ezért az SLE-s betegek utóbbi időben javasolt folyamatos D₃ vitamin szupplementációjában azt javasoljuk a klinikusoknak, hogy ne az egyéb esetekben általánosan ajánlott 25 nM-nak megfelelő (2000 NE/nap) adagnak megfelelő mennyiséggel kezdjenek, hanem jóval kisebbel, és az egyéni, az egyes beteg számára optimális dózis megtalálására, kialakítására törekedjenek.

(Ez a kézirat frissen lett elküldve a Rheumatology International részére).

d. Fokozott miRNS-146a/b, TRAF6 és IRAK1 gén expresszió a Sjögren szindrómás betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben

A miRNS-146a/b, TRAF6, IRAK1 és IRAK4 gének expresszióját 21 Sjögren szindrómás beteg és 10 egészséges kontroll mononukleáris sejtjein vizsgáltuk „quantitative reverse transcription PCR” módszerrel. A betegekben szignifikánsan emelkedett miRNS-146a, TRAF6 és szignifikánsan csökkent IRAK1 expressziót találtunk. Úgy véljük, hogy a magas miRNS-146a mellett megfigyelhető magas TRAF6 szint a Sjögren szindrómára jellemző diagnosztikus, laboratóriumi marker lehet, ami további vizsgálatra érdemes.

(Ez a cikk 2012 januárjában jelent meg az Immunology Letters-ben).

e. A monociták arachidonsav termelésének szabályozása egészséges és SLE-s személyekben. Egy, a PKC enzimekhez kapcsolt modell.

Ebben a modellben az SLE-s sejtek monocitáiban általunk korábban leírtcsökkent arachidonsav termelést a PKC δ izoenzim csökkent expressziójára vezetjük vissza, minek következménye, -többek között- csökkent a PGE₂ termelés, aminek általános gyulladásgátló

hatása lenne. Emellett kevésbé érvényesül a CD4+CD25+FoxP3 pozitív szuppresszor, reguláló T sejtekből felszabaduló az adenzin gátló hatása sem az IL-1 β citokin termelésre. Mindezek következménye egy generalizált proinflammatórius állapot ebben a betegségben (Ez a cikk 2011-ben jelent meg a TheScientificWorldJournal-ben)

Közlemények

1. Váróczy L, Kovács I., Baráth S, Gyimesi E, Illés Á, Zeher M., Sipka S.
„Changes in the number of CD8⁺ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with various autoimmune diseases after autologous haematopoietic stem cell transplantations and their prognostic value”
Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (bírálat alatt)
2. Griger Z., Tóth B. I., Baráth S., Gyetvai Á., Kovács I., Tarr T., Bíró T., Zeher M, Sipka S.
„Different effects of Bortezomib on the expressions of various PKC isoenzymes in T cells of patients with systemic lupus erythematosus and in Jurkat cells.”
Scandinavian Journal of Immunology 75:243-248, 2012 (I.F.1.94)
3. Cziffra G, Tóth B. I, Kovács I, Griger Z, Baráth S, Tarr T, Bíró T, Bodolay E, Zeher M. Sipka S.
„In vitro effects of low and high doses of vitamin D₃ on the expression of protein kinase C isoenzymes and cytokine production in the T lymphocytes of SLE patients and healthy controls”
Rheumatology International (bírálatra elküldve)
4. Zilahi E, Tarr T, Papp G, Griger Z, Sipka S, Zeher M.
„Increased microRNA-146/a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjögren's syndrome”
Immunology Letters 141: 165-168. 2012 (I.F.2.511)
5. Sipka S.
„Adenosine inhibits the release of arachidonic acid in activated human peripheral mononuclear cells. A proposed model for physiologic and pathologic regulation in systemic lupus erythematosus”
TheScientificWorldJOURNAL 11:972-980. 2011. (I.F. 1.524)

Nemzetközi Kongresszusok

1. Sipka S, Kovács I, Baráth S, Tarr T, Zeher M, Boissonneault G.A.
Effects of resolvin E1 on the release of TGFβ, IL-6 and IL-17 from the activated mononuclear cells of healthy donors and SLE and Sjögren's patients in vitro.
European Journal of Immunology, Supplement 1/09 poster :PC14/24 p. S231
2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009
2. Sipka S.
„The CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ regulatory T cells. Their role in diseases and therapy.”
BIT's 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy” (oral presentation)
2010. május 16. Beijing